

70 ANNI DI REUMATOLOGIA ALLE MOLINETTE

Nuovi marcatori di laboratorio nella
sierologia dell'artrite reumatoide

Giulio Mengozzi

S.C. Biochimica Clinica
AOU Città della Salute e della Scienza

Venerdì 11 ottobre 2019



CRONISTORIA

- ☐ Fattore reumatoide (1940)
- ☐ Anticorpi anti-Fattore Perinucleare (APF) (1964)
- ☐ Anticorpi anti-cheratina (AKA) (1979)
- ☐ Anticorpi Sa (1989)
- ☐ Anticorpi anti-Filaggrina (1993)
- ☐ Anticorpi anti-Citrullina (1998)
- ☐ Anticorpi anti-CCP (2000)
- ☐ ??? : CCP1, CCP2, CCP3, MCV (>2001)

Tool diagnostici di AR – ad oggi

- PCR

E' un marker NON-specifico di infiammazione

- VES

E' un marker NON-specifico di infiammazione

- Fattore reumatoide IgM, IgA, IgG

Test con modesta specificità per AR

- ACPA (Anti-citrullinated protein/peptide antibodies),
con fonte antigenica diversa (CCP, CCP2, CCP3, Vimentin...).

Isotipo prevalente IgG, ed in rari casi IgA ed IgM

Anticorpi ad elevata specificità

2010 ACR/EULAR Classification Criteria for RA

JOINT DISTRIBUTION (0-5)

1 large joint	0
2-10 large joints	1
1-3 small joints (large joints not counted)	2
4-10 small joints (large joints not counted)	3
>10 joints (at least one small joint)	5

SEROLOGY (0-3)

Negative RF <u>AND</u> negative ACPA	0
Low positive RF <u>OR</u> low positive ACPA	2
High positive RF <u>OR</u> high positive ACPA	3

SYMPTOM DURATION (0-1)

<6 weeks	0
≥6 weeks	1

ACUTE PHASE REACTANTS (0-1)

Normal CRP <u>AND</u> normal ESR	0
Abnormal CRP <u>OR</u> abnormal ESR	1

≥ 6 = definite RA

What if the score is <6?

Patient might fulfill the criteria...

→ **Prospectively** over time
(cumulatively)

→ **Retrospectively** if data on all
four domains have been
adequately recorded in the past

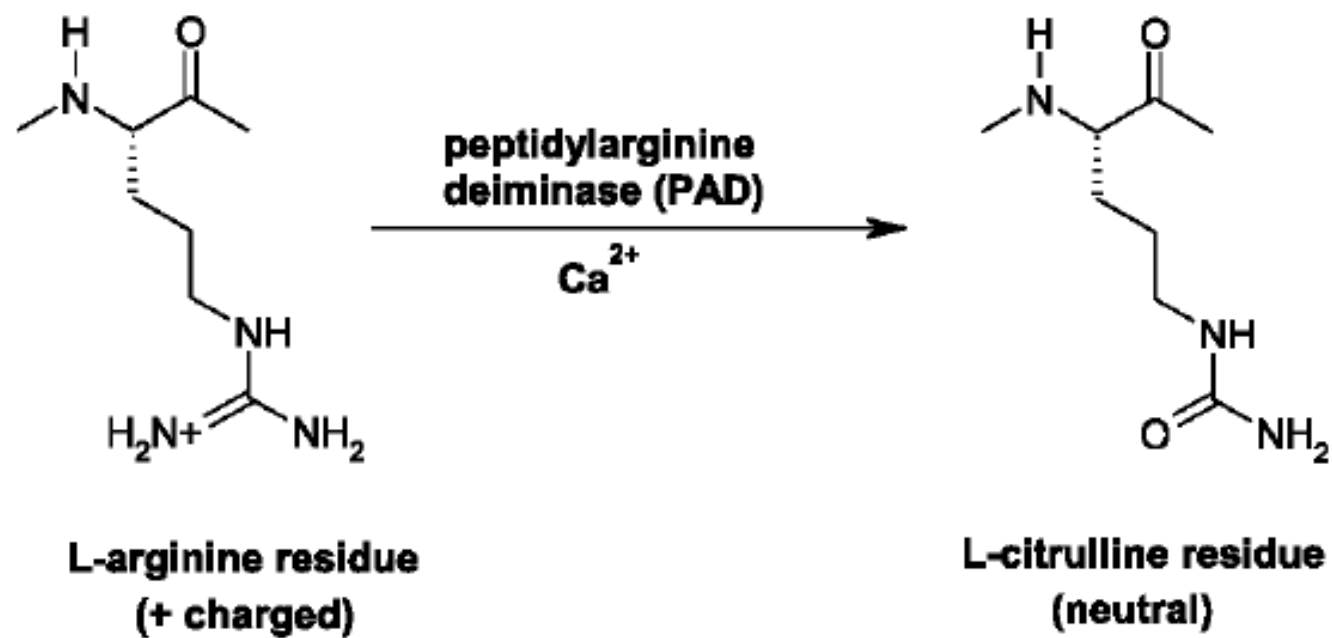


AMERICAN COLLEGE
OF RHEUMATOLOGY
EDUCATION • TREATMENT • RESEARCH

eular

Frequenza del FR nelle malattie autoimmuni

<u>Malattia</u>	<u>% FR</u>
Rheumatoid Arthritis	50-90 (titolo elevato)
Sjögren's Syndrome	75-95 (titolo elevato)
SLE	15-35
Systemic Sclerosis	20-30
Polymyositis/Dermatomyositis	5-10
Cryoglobulinemia	40-100
MCTD	50-60



Van Boeckel MAM et al . Autoantibody systems in RA. Arthritis Res 2002;4:87-93

Epitopes	Antibodies	Sensitivity	Specificity	Reference
Pro-filaggrin / Keratin	AKA	48%	98%	(16)
	APF	-	-	-
	Anti-fil 306-326	42%	95%	(17)
	Anti-fil 311-315	72%	95%	(17)
	Anti-keratin 8	68%	80%	(29)
Vimentin	Anti-MCV	39-79%	73.8-100%	(16-18)
	Anti-Sa	37-50%	97-99%	(19, 20)
Alpha-enolase	Anti-CEP1	44%	97%	(39)
Fibrinogen/Fibrin	Anti-FibA	48%	95%	(32)
	Anti- β 60-74Cit _{60,72,74}	70-73%	95%	(32, 33)
	Anti- α 36-50Cit _{38,42}	45-50%	95%	(32, 33)
Viral peptides	Anti-EBNA35-58Cit	36%	98%	(35)
	Anti-VCP2	61%	95%	(23)
Glucose-6.phosphate isomerase	Anti-GPI	75%	64%	(16)
	Anti CCG (1-9)	-	-	(39)
Collagen	Anti-telopeptides type I	47%	96%	(24)
	Anti-telopeptides typell	41%	94%	(24)
	Anti-type II collagen	30%	-	(17)

Test CCP ELISA di 1a generazione

- Test ELISA descritto da Schellekens et al su ARTHRITIS & RHEUMATISM nel 2000
- La citrullina è essenziale per l'antigenicità
- Peptidi sintetici ottenuti da sequenze di filaggrina
- Le forme “cicliche” sono ottimali per il riconoscimento degli anticorpi AR
- Sensibilità = 48%
- Specificità = 96%

Test CCP ELISA di 2a generazione

- La risposta immune dei pazienti AR è di tipo policlonale e probabilmente non solo verso gli epitopi filaggrina
- Definizione di una libreria di peptidi di screening
- Selezione di differenti peptidi (scelti e definiti sulla base della reattività con sieri di pazienti affetti da AR) da coattare sulla fase solida dei test ELISA
- Prestazioni analitiche/cliniche superiori a CCP1, in termini di: stabilità, epitopi completi anche di tipo conformazionale
- Sensibilità: 68%
- Specificità: 98%

Test CCP ELISA di 3a generazione

Mix di Peptidi Ciclici Citrullinati diverso dal mix CCP2

- Prestazioni analitiche/cliniche comparabili alla CCP2 nella diagnosi di RA
- Superiore capacità a rilevare pazienti di Early RA

	RF	CCP
Sensitivity	62%	68%
Specificity	87%	95%

- Sensibilità insufficiente
- Ed ancor di più nella patologia in fase precoce
- Quali informazioni sulla prognosi (patologia erosive)?
- Quali informazioni per il monitoraggio della terapia?
- Quali informazioni per il monitoraggio della attività di malattia?

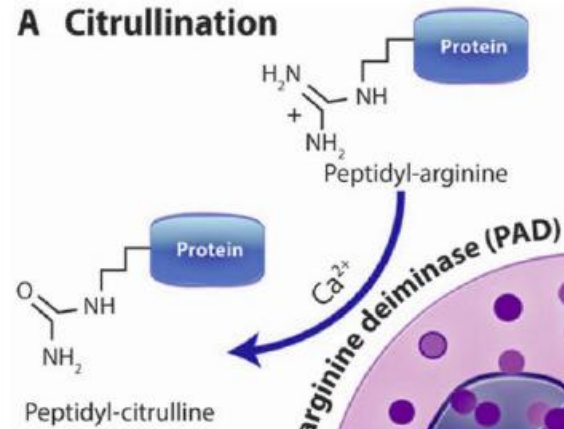
- ◆ Circa il 70 % (solamente !!!) dei pazienti con Artrite Reumatoide sono positivi al test APCA (CCP)
- ◆ Il Fattore Reumatoide aiuta a 'scoprire' una parte di ulteriori pazienti (10 % circa), ma compromettendo notevolmente la specificità
- ◆ Circa il 36 % (solamente !!!) dei pazienti RA pre-sintomatici sono positivi al test APCA (CCP)

✓ Anti-CarP/A1AT

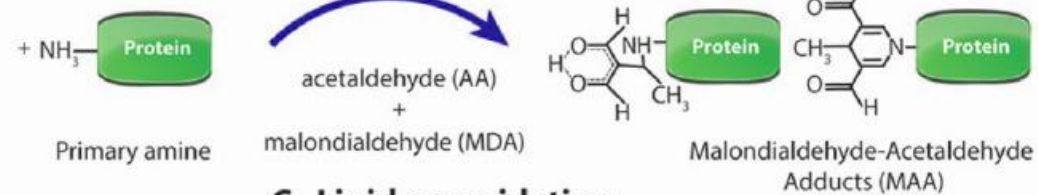
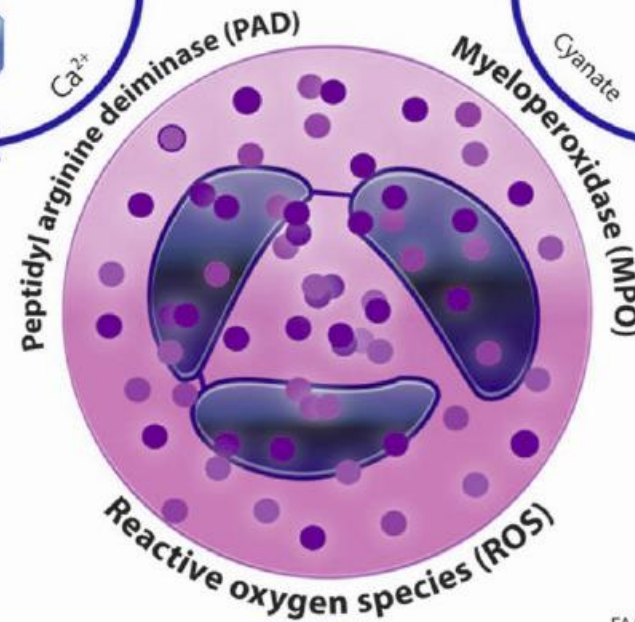
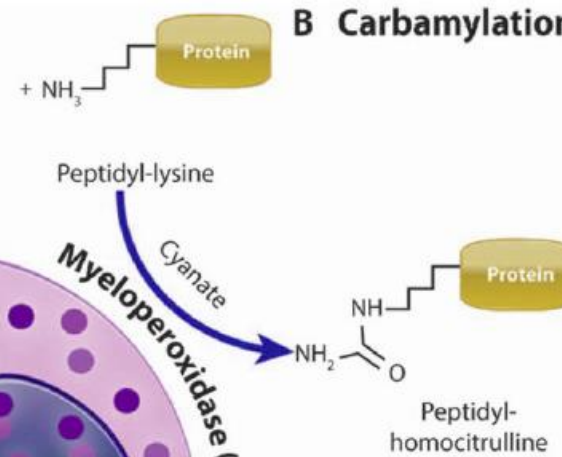
✓ Anti-PAD 2/3/4

✓ Calprotectina (siero)

A Citrullination

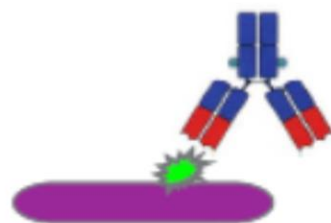


B Carbamylation



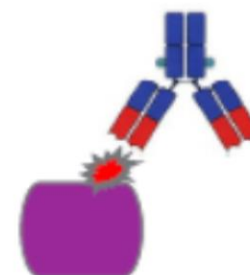
C Lipid peroxidation

ACPA

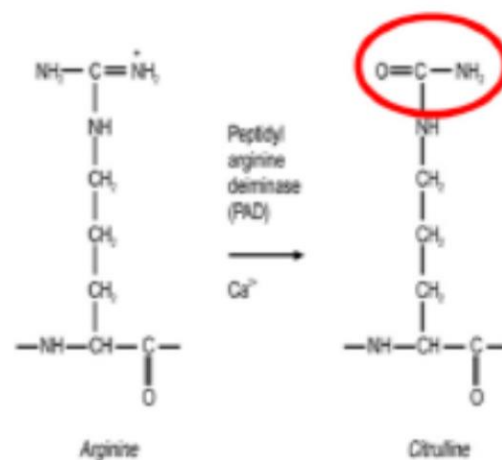


Citrullination	Carbamylation
-D-V-E-R-G-H-D- PAD-enzymes \downarrow -D-V-E-cit-G-H-D-	-V-F-G-K-F-D-H- Chemical reaction by Cyanate \downarrow $\text{-V-F-G-homocit-F-D-H-}$
ACPA	Anti-CarP

Anti-CarP



Citrullinazione



Carbamilazione

- Il 16% (IgA) e 30% (IgG) di pazienti con RA confermata ed APCA seronegativi sono positivi al test Anti-CarP (*test basato su Ca-FCS*)

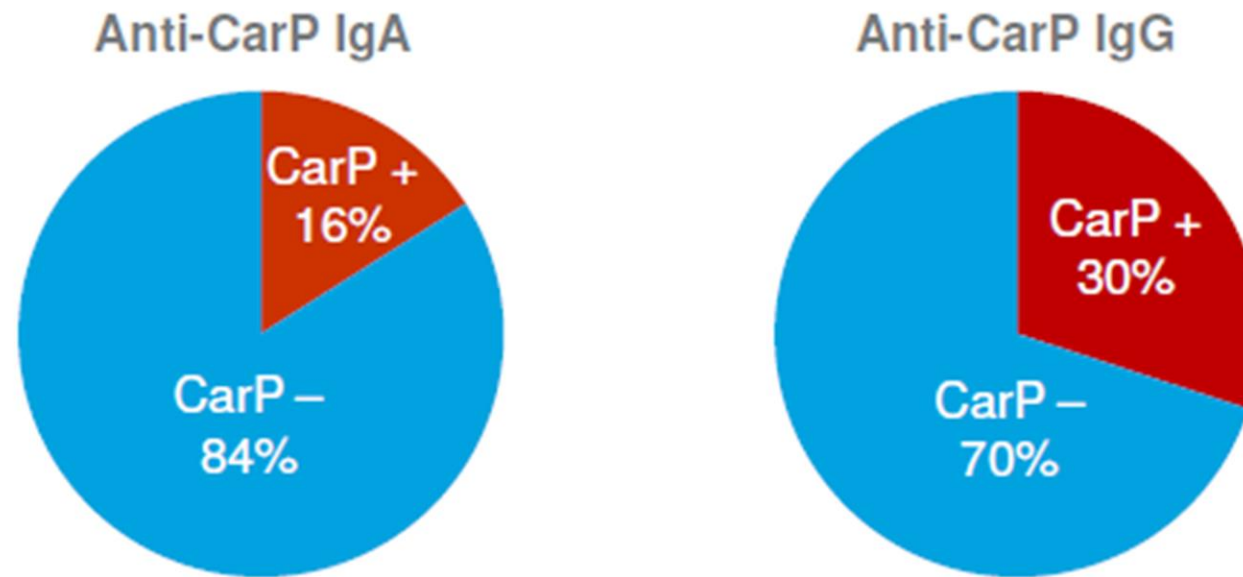
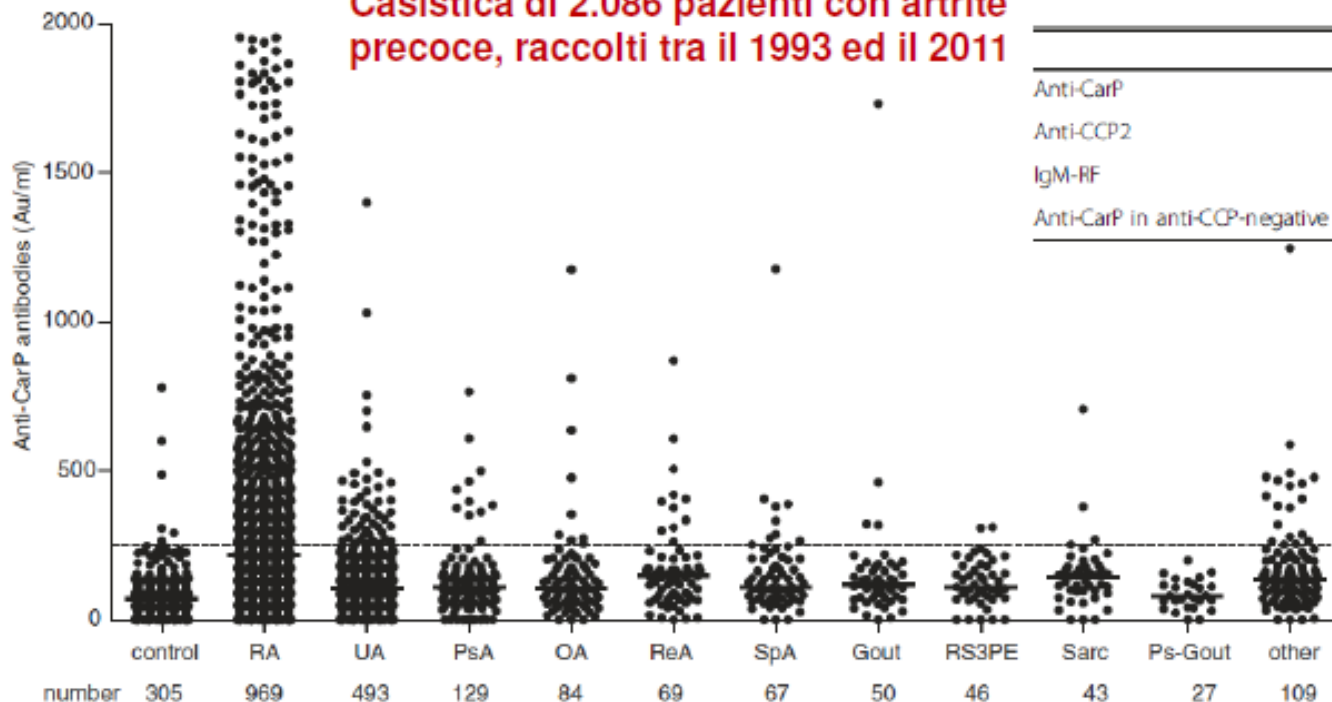


Table III - Sensitivity and specificity of anti-Carbp antibodies.

Author	Year	N° Pts	Sensitivity	Specificity	Reference
Brink et al.	2015	423	42% (RA patients) 19% (Prior diagnosis)	97%	(55)
Gan et al.	2015	76	26% (Prior diagnosis)	95%	(56)
Yee et al.	2014	120	30%	No controls	(62)
Shi et al.	2014	79	27% (for anti-Ca-FCS) 38% (for anti-Ca-Fib)	No data	(63)
Jiang et al.	2014	1985+846	36-45% (for anti-Ca-FCS) 38-43% (for anti-Ca-Fib)	No data	(61)
Challener et al.	2016	212	46% (seropositive RA patients) 9% (seronegative RA patients)	No data	(22)
Shi et al.	2015	969	44%	89%	(57)
Pecani et al	2016	309	46.8% 29.5% (seronegative RA patients)	91.95%	(59)

Casistica di 2.086 pazienti con artrite precoce, raccolti tra il 1993 ed il 2011



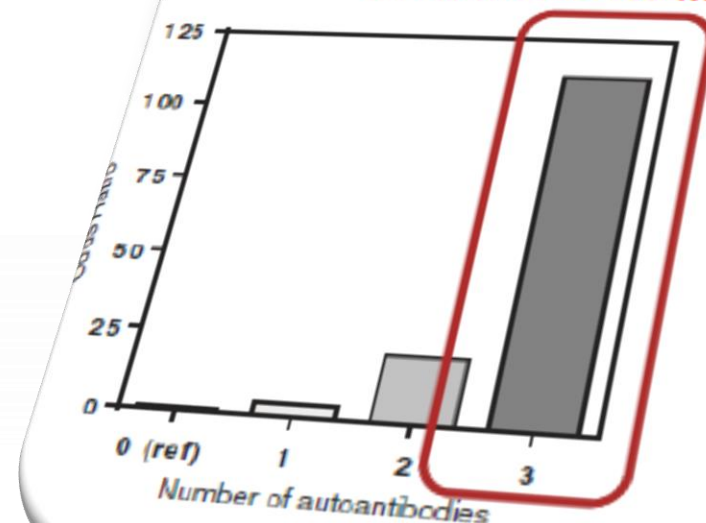
	Sensitivity	Specificity
Anti-CarP	44 %	89 %
Anti-CCP2	54 %	96 %
IgM-RF	59 %	91 %
Anti-CarP in anti-CCP-negative patient	12 %	91 %

Shi J, et al. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:339.

Shi J, et al. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:339.

ANTI-CARP
PREVALENZA E TITOLO NELLE ARTRITI CLINICHE PRECOCI

ACPA + RF, OR = 36.7
Adding CarP, OR = 112.2
OR Increase 3.0 !!!



- La A1AT è una proteina ricca di residui di Lisina,
- Rappresenta un candidato **ideale per formare epitopi** carbammati,
- La A1AT è stata rilevata in forma carbammatata nelle articolazioni di pazienti AR,
- E' coinvolta nel processo di infiammazione.

- Identificano pazienti AR negativi ad RF/ACPA in circa 30% dei casi (1).
- Sono un marker precoce AR e compaiono anche 6 anni prima dello sviluppo della malattia (2, 3, 4).
- Correlano con il danno erosivo (Yee et al. 2015).
- Sono un fattore di rischio di sviluppare AR in pazienti con Artralgia
- Aiutano ad identificare tra i pazienti con artrite precoce quelli con maggiore rischio di evoluzione erosiva, con o senza positività RF/APCA (1, 5).
- Possono essere un grande valore aggiunto se usato come algoritmo combinato con RF e CCP, in particolare nella tripla positività (7).
- Confermata evidenza della utilità clinica di Anti-CarP-A1AT per la prognosi di AR, ed altre patologie autoimmuni (LES, SSj, AII), per monitorare la attività/severità della malattia
- Sono positivi nelle forme Artrite Reumatoide Senile (EORA)

1Shi et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108.

2Shi et al. *Arthritis Rheum*. 2013;65.

3Shi et al. *Arthritis Rheum*. 2014;73.

4Brink et al. *Arth Res Ther*. 2016;18.

5Yee A, et al. *Immunol Res*. 2015, 61.

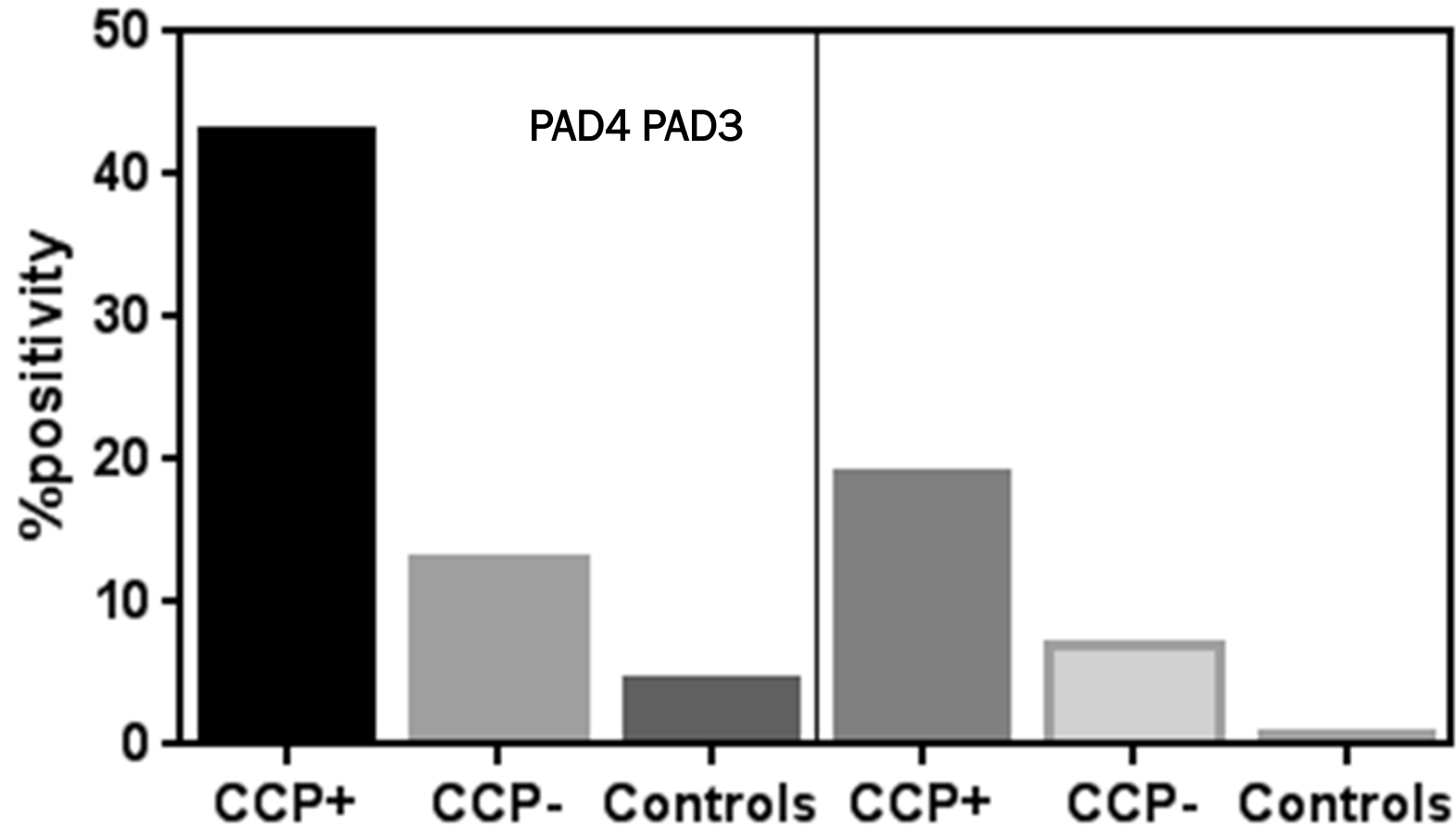
6Veuler et al. *J Autoimmun*. 2017;80.

7Verheul et al. *Arthritis Rheumatol*. 2018; 70

Reyes-Castillo Z, Muñoz-Valle JF, Llamas-Covarrubias MA. Clinical and immunological aspects of anti-peptidylarginine deiminase type 4 (anti-PAD4) autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2018, 17:94-102

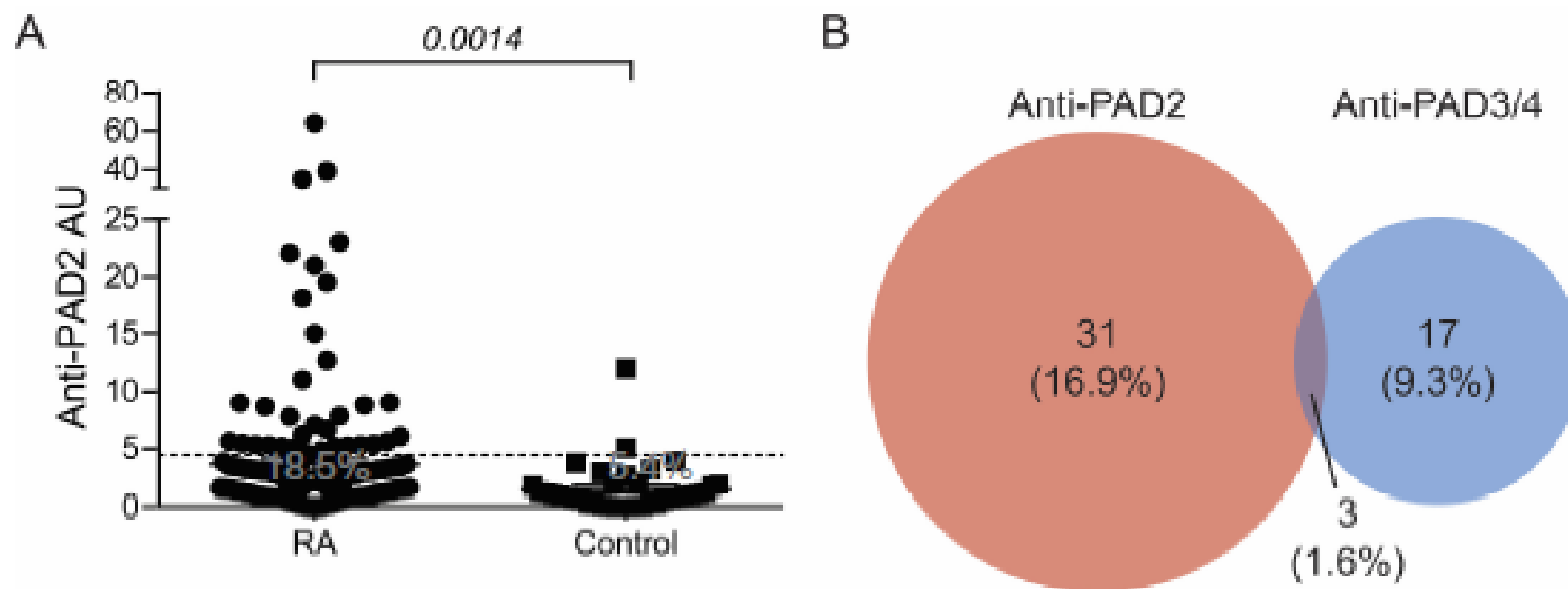
Table 1
Sensitivity and specificity of anti-PAD4 autoantibodies in rheumatoid arthritis (RA).

Author and year [Reference]	Detection method	RA patients (n)	RA stage	Rheumatic controls ^a (n)	Healthy controls (n)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Takizawa et al., 2005 [6]	ELISA and WB	42	Established	42	40	50	95 ^c
Halvorsen et al., 2007 [7]	ELISA	237 and 177 ^b	Established	84	148	22–25	91 ^c
Zhao et al., 2008 [68]	ELISA and WB	109	Established	232	106	45	94
Harris et al., 2008 [8]	IPP	38 and 129 ^b	Established	126	32	36–42	99
Auger et al., 2009 [69]	Microarray and ELISA	116	Established	33	60	29	97
Kolfenbach et al., 2010 [72]	IPP	83	Preclinical	–	83	18	99
Wang et al., 2011 [70]	ELISA	103	Established	139	100	32	94 ^c
Reyes-Castillo et al., 2015 [71]	ELISA	170	Early ^d and established	–	103	18–29 ^e	95
Umeda et al., 2016 [9]	ELISA	148	Established	73	40	30	100
Navarro-Millán et al., 2016 [75]	IPP	192	Early ^d and established	–	–	24	–



Antibodies targeting protein-arginine deiminase 4 (PAD4) demonstrate diagnostic value in rheumatoid arthritis. Martinez-Prat L et al. Ann Rheum Dis. 2018

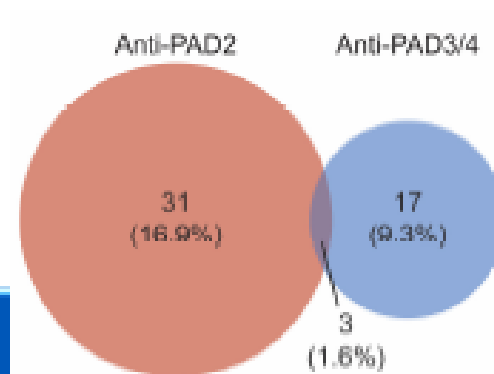
- Gli anti-PAD2 sono stati rilevati in un altro subset di pazienti AR (Darrah *et al.* 2016).
- Gli anti-PAD2 sembrano associati ad una minore progressione radiografica ed assenza di interstiziopatia (Darrah *et al.* 2016).



Darrah *et al.* [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (suppl 10).
Blachere *et al.* *Arthritis Rheumatol* 2017, 69:986-995.

Anticorpi anti-PAD2

NON associati con HLA-DR SE
NON associate con gli anti-CCP
Malattia con minore progressione della erosione articolare
Minor interessamento polmonare (ILD)
Associato al genere femminile
Associato con uso di biologici DMARD



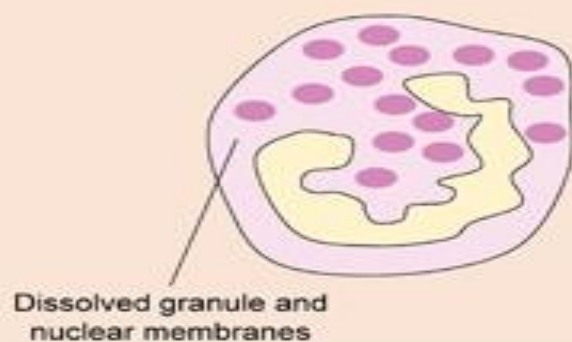
Anticorpi Anti-PAD3/4

Associati con HLA-DR SE
Associati con gli anti-CCP
Malattia con erosione più attiva
Associati al fumo
Progressione malattia nonostante il trattamento
Elevato rischio di ILD

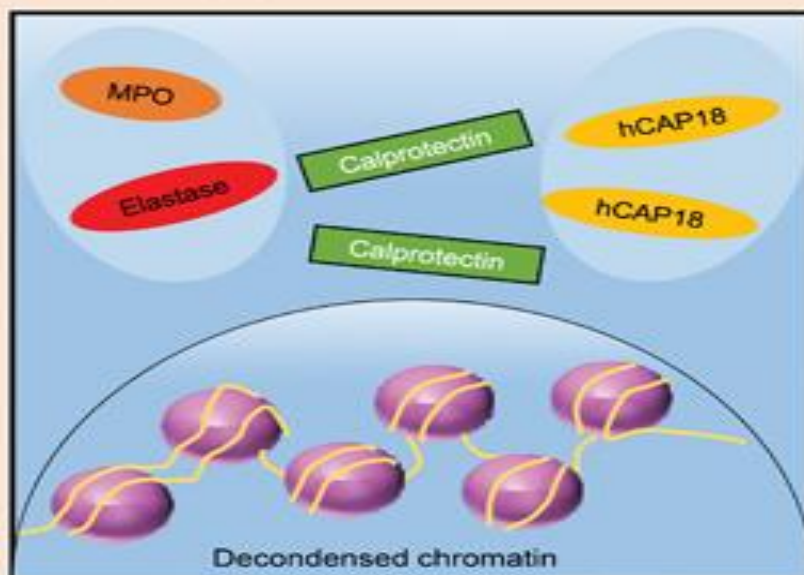
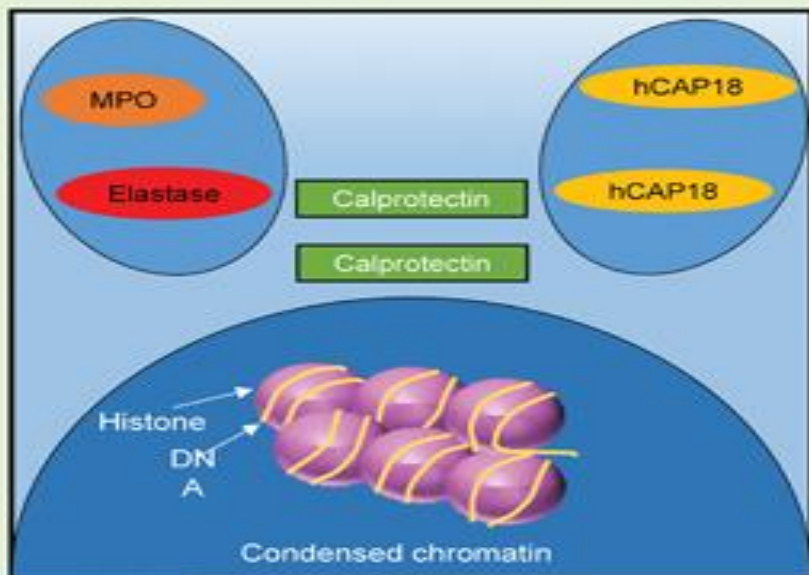
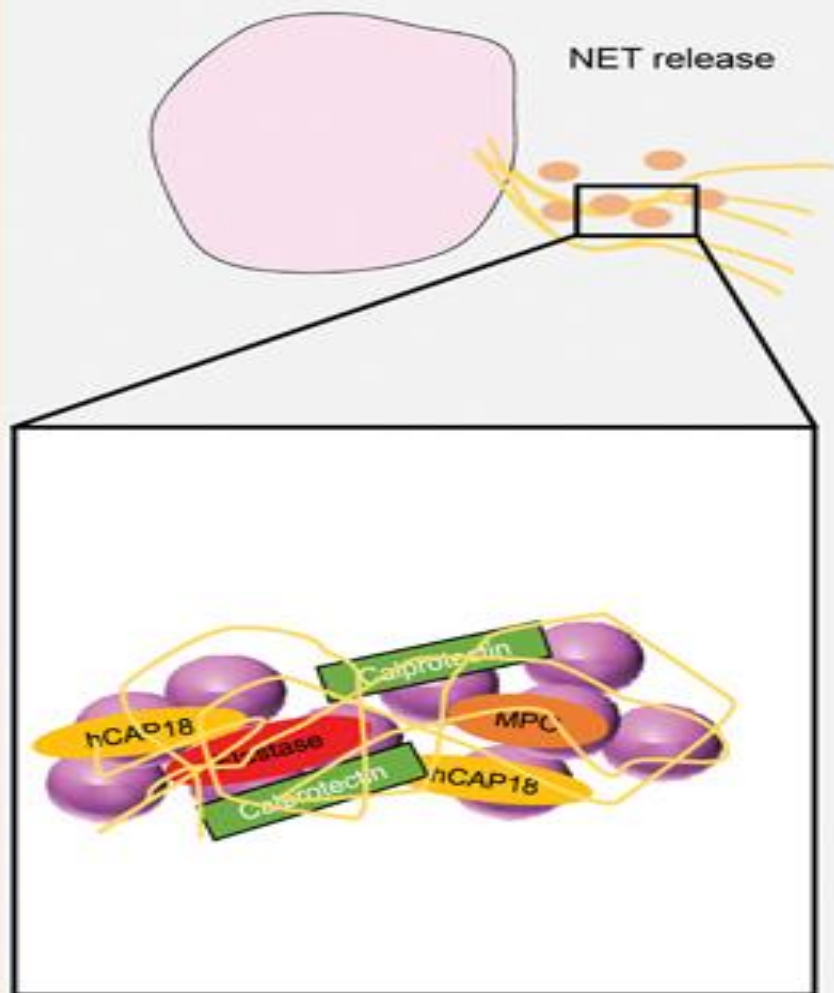
Quiescent neutrophil

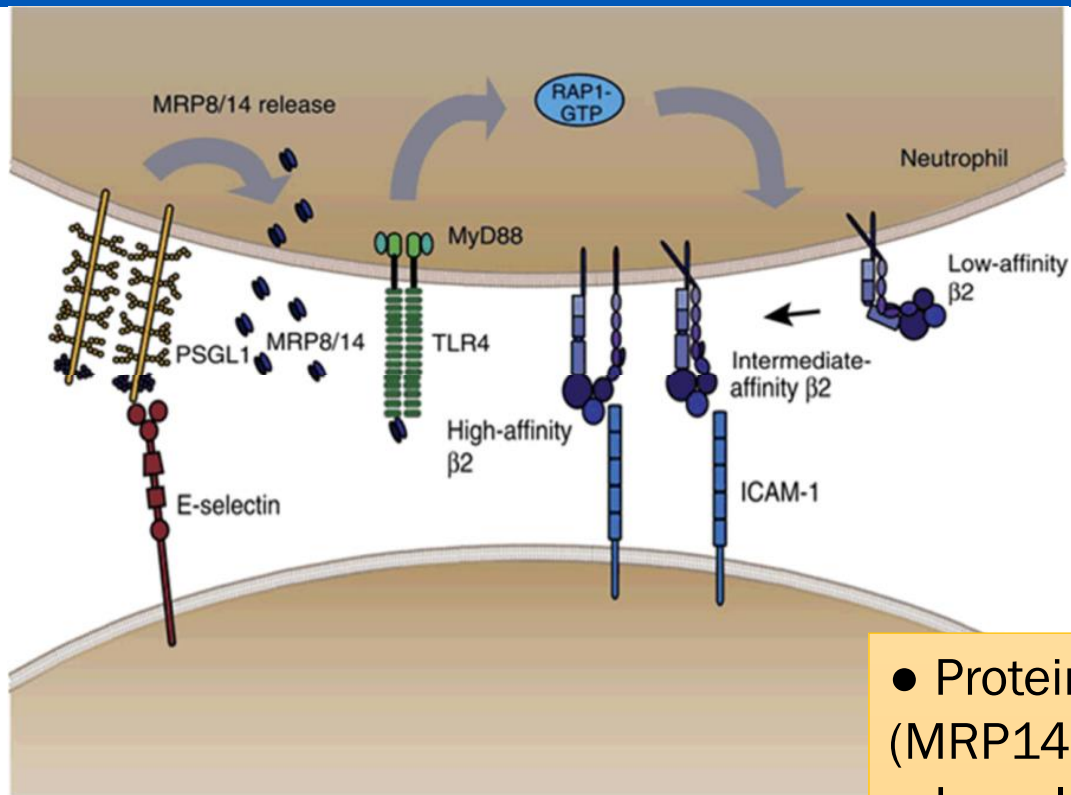


Activated neutrophil



Neutrophil without nucleus





- Proteina con PM di 36 kDa, costituita da due catene pesanti (MRP14 o S100A9) e da una leggera (MRP8 o S100A8).
- La calprotectina fecale viene rilasciata dai granulociti come risposta al processo di infiammazione,
- La calprotectina fecale è un marker consolidato per l'infiammazione intestinale e permette la differenziazione tra IBD e IBS
- C'è un forte interesse a valutare i livelli di calprotectina nel siero nelle patologie autoimmune con processi infiammatori

- Marker di infiammazione con potenziale valore in autoimmunità
 - Potrebbe essere superiore a PCR nel predire la infiammazione sinoviale (Hurnakova *et al.* 2015 and 2017, Nordal *et al.* 2017) e danno articolare (Kang *et al.* 2014).
 - E' un marker di infiammazione per monitorare la attività di malattia nei pazienti AR (Hurnakova *et al.* 2015 and 2017) (Jonsson *et al.* 2017).
- E' in aumento il numero di pubblicazioni sulla utilità della calprotectina sierica nel predire la risposta terapeutica nella AR e nella JIA (Obry *et al.* 2014, Inciarte-Mundo *et al.* 2015, Choi *et al.* 2015, Nair *et al.* 2016, Nordal *et al.* 2017) (Anink *et al.* 2015).

E' elevata in numerose condizioni patologiche, senza specificità per una in particolare

- Permette di differenziare i pazienti AR “Responder” e “NON-Responder” al trattamento DMARDS
- Il livello correla con la risposta al DMARDS nei pazienti AR
- Correla con l'attività di malattia
- E' un marker promettente per il monitoraggio della terapia

Fattore reumatoide

- Early diagnosis and prediction in individuals at risk for early treatment

Anti CCP

- Early diagnosis and prediction in individuals at risk for early treatment
- Identification of patients for more aggressive treatment

Anti CarP/AIAT

- Identification of patients for more aggressive treatment
- Prognosis: Joint erosions and disease activity

Anti PAD

- Identification of patients for more aggressive treatment
- Identification of patients for PAD inhibitor treatment
- Prognosis: Joint erosions

Calprotectina

- Treatment response to TNF inhibitors
- Potential marker for selection of patients for more aggressive treatment
- Dose adjustment